

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-357591

(P2004-357591A)

(43) 公開日 平成16年12月24日(2004.12.24)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 9/10	C 1 2 N 9/10	4 B 0 5 0
C 1 2 P 19/18	C 1 2 P 19/18	4 B 0 6 4
//(C 1 2 N 9/10	C 1 2 N 9/10	
C 1 2 R 1:01 )	C 1 2 R 1:01	
(C 1 2 N 9/10	C 1 2 N 9/10	
審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 13 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-160235 (P2003-160235)	(71) 出願人	390010205
(22) 出願日	平成15年6月5日 (2003.6.5)		第一ファインケミカル株式会社
			富山県高岡市長慶寺530番地
		(74) 代理人	110000109
			特許業務法人特許事務所サイクス
		(72) 発明者	和田 浩一
			富山県高岡市長慶寺530番地 第一ファ
			インケミカル株式会社内
		(72) 発明者	坂本 恵司
			富山県高岡市長慶寺530番地 第一ファ
			インケミカル株式会社内
		(72) 発明者	浅野 泰久
			富山県富山市千石町2丁目6-4-803
		Fターム (参考)	4B050 CC01 DD02 DD03 DD04 EE02
			FF04E FF11E FF12E LL05
			最終頁に続く

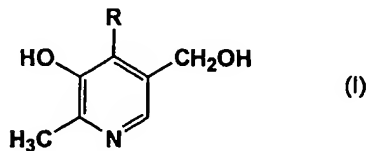
(54) 【発明の名称】 糖転移酵素およびその製造方法

(57) 【要約】

【課題】 ピリドキシン及びその類縁化合物に作用して  $\alpha$ -グルコシド化合物を生成する糖転移酵素を提供する。

【解決手段】 下記の一般式 (I) :

【化 1】



(式中、R は水素原子、低級アルキル基、低級ヒドロキシアルキル基、カルボキシル基、又はアルデヒド基を示す) で表される化合物に作用して、下記の一般式 (II) :

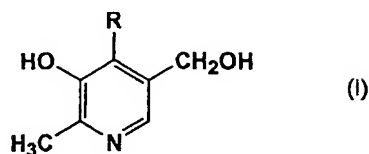
【化 2】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記の一般式 (I) :

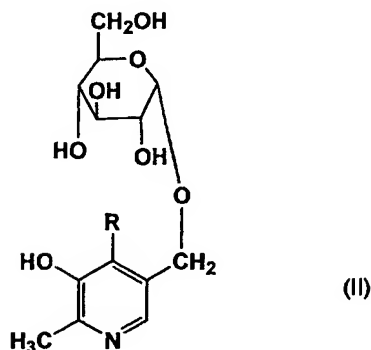
【化 1】



10

(式中、R は水素原子、低級アルキル基、低級ヒドロキシアルキル基、カルボキシル基、又はアルデヒド基を示す) で表される化合物に作用して、下記の一般式 (II) :

【化 2】



20

(式中、R は上記と同義である) で表される化合物を生成することができる糖転移酵素であって、以下の理化学的性質:

至適 pH : 6 ~ 7

至適温度 : 約 60 °C

分子量 : 約 137,000

を有する糖転移酵素。

30

【請求項 2】

一般式 (I) で表される化合物の 5' 位の水酸基を位置選択的に配糖化して α-グルコシド化する作用を有する請求項 1 に記載の糖転移酵素。

【請求項 3】

R がヒドロキシメチル基である請求項 1 又は 2 に記載の糖転移酵素。

【請求項 4】

下記のいずれかの群: レイフソニア属、パエニバチルス属、シュードノカルディア属、クリプトコッカス属、コリオルス属、ユーロチウム属、フラムリナ属、ガノデルマ属、グリオクラディウム属、ヘリコスティルム属、モルティエレラ属、ピソマイセス属、シゾフィラム属、トラメテス属、又はベルティシリウム属に属する微生物に由来する請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載の糖転移酵素。

40

【請求項 5】

ベルティシリウム属に属する微生物に由来する請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載の糖転移酵素。

【請求項 6】

請求項 1 ないし 3 に記載の糖転移酵素の製造方法であって、請求項 1 に記載の一般式 (I) で表される化合物に作用して請求項 1 に記載の一般式 (II) で表される化合物を生成することができる糖転移酵素を産生する微生物を培養し、得られた培養物から該糖転移酵素を分離・採取する工程を含む方法。

【請求項 7】

50

該微生物が下記のいずれかの群：レイフソニア属、パエニバチルス属、シュードノカルディア属、クリプトコッカス属、コリオルス属、ユーロチウム属、フラムリナ属、ガノデルマ属、グリオクラディウム属、ヘリコスティルム属、モルティエセラ属、ピソマイセス属、シゾフィルム属、トラメテス属、又はベルティシリウム属に属する微生物である請求項6に記載の方法。

【請求項8】

請求項1に記載の一般式(I I)で表される化合物の製造方法であって、請求項1に記載の一般式(I)で表される化合物に請求項1ないし5に記載の糖転移酵素を作用させる工程を含む方法。

【請求項9】

ホウ酸及び／又はホウ酸塩の存在下で糖転移酵素を作用させる請求項8に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ピリドキシン及びその類縁化合物に作用して $\alpha$ -グルコシド化合物を生成する糖転移酵素に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

ピリドキシン(PN)は、ピリドキサル(PL)、ピリドキサミン(PM)とともにビタミンB6作用を持つ物質の一つである。細胞に取り込まれたPNはリン酸化されてピリドキシン-5'-リン酸(PNP)となり、さらに酸化されてピリドキサル-5'-リン酸(PLP)に変換され、アミノ酸代謝にあずかる酵素の補酵素として重要な役割を果たしている。

【0003】

ピリドキシンの塩酸塩(PN·HCl)は、水によく溶けるが、光に対して不安定であり、また、酸味や苦味があるという問題を有している。一方、その配糖体であるピリドキシン- $\alpha$ -グルコシドは、光安定性に優れており[J. Vitaminol., 17, 121-124 (1971)]、酸味や苦味がないかあるいは緩和されている。また、経口投与された場合、腸管でそのままの形で吸収され、速やかにピリドキサルリン酸に変換されることが動物実験で確認されており、医薬としての有用性が高い[J. Nutr. Sci. Vitaminol., 42, 377-386 (1996)]。加えて、ピリドキシン- $\alpha$ -グルコシドは、さまざまな製剤形において安定性が高く(特開2002-255368号公報)、またそれを含む外用剤が、肌荒れ改善やヒゲソリ負け防止に有効(特開2002-265316号公報)とされている。

【0004】

ピリドキシン- $\alpha$ -グルコシドには5'位と4'位の配糖体が存在するが、ピリドキシン-5'- $\alpha$ -グルコシドはホモジェネートされた肝細胞によって速やかにPNに加水分解されることから、医薬品や健康食品として有用性が高く、大量生産が望まれるところである。これまで報告されている微生物菌体又はそれより生成した酵素を用いたピリドキシン-5'- $\alpha$ -グルコシドの製造法としては、Micrococcus属菌体を用いる方法

[特公昭46-33198号公報(1971)、J. Vitaminology 15, 142-150 (1969)、J. Vitaminology 15, 160-166 (1969)、特公昭49-18230号公報(1974)、及びJ. Vitaminology 15, 167-173 (1969)]、Mucor javanicus IF04570から精製した酵素を用いる方法[応用糖質科学43, 369-372 (1996)、Methods in Enzymology, 280, 66-71 (1997)]、Bacillus macerans又はBacillus stearoothermophilus 由来のCGTase(シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ)を用いる反応[Methods in Enzymology, 280, 66-71 (1997)]などがあるが、いずれも生成率が低かったり

10

20

30

40

50

、5'位選択率が低く、生産量において満足のいく結果が得られていない。また、5'位選択率が低い場合は、副生成物のピリドキシン-4'- $\alpha$ -グルコシドの量が多いため、これを除去するためにさらなる精製処理が必要で工程が複雑になり、また、ピリドキシン-4'- $\alpha$ -グルコシドの基質としての再利用が難しくなるなどの問題があった。

#### 【0005】

本発明者は、上記課題を解決すべく種々の微生物を対象としてピリドキシンからピリドキシン  $\alpha$ -グルコシドを生成する菌株を広くスクリーニングした結果、細菌又は真菌のなかに所望の糖転移活性を有する微生物を見出した。この微生物を用いると効率的にピリドキシン-5'- $\alpha$ -グルコシドを製造でき、高い5'位選択性が達成できる（非特許文献1）。しかしながら、この刊行物では、この糖転移活性を担うと考えられる酵素は特定されてい

10

【非特許文献1】Biocsi. Biotechnol. Biochem., 67, pp. 508-516, 2003

【非特許文献2】Biocsi. Biotechnol. Biochem., 67, pp. 499-507, 2003

【非特許文献3】日本農芸化学会2002年度大会, 大会要旨集, pp. 198

【非特許文献4】日本農芸化学会2003年度大会, 大会要旨集, pp. 36

#### 【0006】

【発明が解決しようとする課題及び課題を解決するための手段】

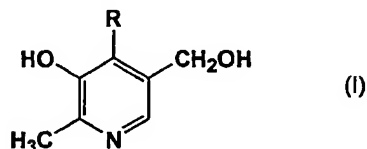
本発明の課題は、ピリドキシン又はその類縁化合物の  $\alpha$ -グルコシドを効率的に製造する手段を提供することにある。より具体的には、ピリドキシン及びその類縁化合物に作用して  $\alpha$ -グルコシド化合物を生成する糖転移酵素を提供することが本発明の課題である。本発明者らは鋭意研究を進めた結果、上記の特徴を有する糖転移酵素を分離することに成功した。本発明は上記の知見を基にして完成されたものである。

20

#### 【0007】

すなわち、本発明により、下記の一般式（I）：

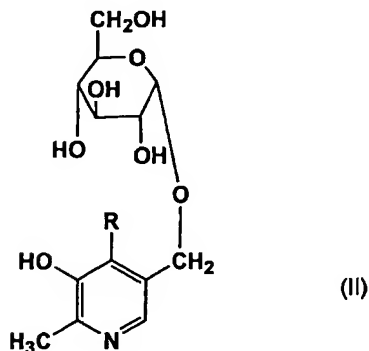
#### 【化3】



30

（式中、Rは水素原子、低級アルキル基、低級ヒドロキシアルキル基、カルボキシル基、又はアルデヒド基を示す）で表される化合物に作用して、下記の一般式（II）：

#### 【化4】



40

（式中、Rは上記と同義である）で表される化合物を生成することができる糖転移酵素であって、以下の理化学的性質：

至適 pH：6～7

50

至適温度：約 60℃

分子量：約 137,000

を有する糖転移酵素が提供される。

【0008】

上記の発明の好ましい態様によれば、一般式 (I) で表される化合物の 5' 位の水酸基を位置選択的に配糖化して  $\alpha$ -グルコシド化する作用を有する上記の糖転移酵素；R がヒドロキシメチル基である上記の糖転移酵素；下記のいずれかの群：レイフソニア属、パエニバチルス属、シュードノカルディア属、クリプトコッカス属、コリオルス属、ユーロチウム属、フラムリナ属、ガノデルマ属、グリオクラディウム属、ヘリコスティルム属、モルティエレラ属、ピソマイセス属、シゾフィルム属、トラメテス属、又はベルティシリウム属に属する微生物に由来する上記の糖転移酵素；及び、ベルティシリウム属に属する微生物に由来する上記の糖転移酵素が提供される。

10

【0009】

別の観点からは、上記の糖転移酵素の製造方法であって、上記一般式 (I) で表される化合物に作用して上記一般式 (II) で表される化合物を生成することができる糖転移酵素を産生する微生物を培養し、得られた培養物から該糖転移酵素を分離・採取する工程を含む方法が提供される。この発明の好ましい態様では、該微生物は、下記のいずれかの群：レイフソニア属、パエニバチルス属、シュードノカルディア属、クリプトコッカス属、コリオルス属、ユーロチウム属、フラムリナ属、ガノデルマ属、グリオクラディウム属、ヘリコスティルム属、モルティエレラ属、ピソマイセス属、シゾフィルム属、トラメテス属、又はベルティシリウム属に属する微生物である。

20

【0010】

さらに別の観点からは、上記一般式 (II) で表される化合物の製造方法であって、上記一般式 (I) で表される化合物に上記の糖転移酵素を作用させる工程を含む方法が本発明により提供される。この発明の好ましい態様では、ホウ酸及び／又はホウ酸塩の存在下で糖転移酵素を作用させることにより、5' 位の  $\alpha$ -グルコシド化の選択性を高めることができる。

【0011】

【発明の実施の形態】

本発明の糖転移酵素は、上記一般式 (I) で表される化合物に作用して、上記一般式 (II) を生成することができる糖転移酵素であって、以下の理化学的性質：至適 pH：6～7、至適温度：約 60℃、分子量：約 137,000 を有することを特徴としている。

30

【0012】

一般式 (I) 及び (II) において、R は水素原子、低級アルキル基、低級ヒドロキシアルキル基、カルボキシル基、又はアルデヒド基を示す。低級アルキル基としては、例えば、炭素数 1 から 6 個程度の直鎖状又は分枝鎖状のアルキル基を用いることができ、より具体的には、メチル基、エチル基、n-プルピル基、イソプロピル基、n-ブチル基、sec-ブチル基、tert-ブチル基、イソブチル基、n-ペンチル基、又は n-ヘキシル基などを例示することができる。これらのうち、メチル基又はエチル基が好ましく、メチル基がより好ましい。また、低級ヒドロキシアルキル基のアルキル部分も同様である。低級ヒドロキシアルキル基に存在する水酸基の個数は特に限定されないが、好ましくは 1 個である。低級ヒドロキシアルキル基としては、ヒドロキシメチル基が好ましい。R としては、ヒドロキシメチル基が最も好ましい。

40

【0013】

本発明の糖転移酵素は、上記一般式 (I) で表される化合物に作用して上記一般式 (II) で表される化合物を生成することができる糖転移酵素を産生する微生物（以下、「本発明の糖転移酵素の産生菌」と略す場合がある。）を培養した培養物から分離・採取することができる。本発明の糖転移酵素の産生菌の種類は特に限定せず、細菌、放線菌、酵母、カビなどの任意の微生物であってもよい。例えば、本発明の糖転移酵素の生産菌は、レイフソニア (*Leifsonia*) 属、パエニバチルス (*Paenibacillus*) 属

50

に属する細菌；シュードノカルディア (*Pseudonocardia*) 属に属する放線菌；クリプトコッカス (*Cryptococcus*) 属に属する酵母；コリオルス (*Coriolus*) 属、ユーロチウム (*Eurotium*) 属、フラムリナ (*Flammulina*) 属、ガノデルマ (*Ganoderma*) 属、グリオクラディウム (*Gliocladium*) 属、ヘリコスティラム (*Helicostylum*) 属、モルティエラ (*Mortierella*) 属、ピソマイセス (*Pithomyces*) 属、シゾフィラム (*Schizophyllum*) 属、トラメテス (*Trametes*) 属、ベルティシリウム (*Verticillium*) 属に属するカビから選択することができるが、これらの微生物に限定されることはない。好ましくはベルティシリウム属に属する微生物を用いることができる。

10

## 【0014】

より具体的な微生物種としては、例えば、レイフソニア アクアティカ (*Leifsonia aquatica*)、パエニバチルス アルベイ (*Paenibacillus alvei*)、シュードノカルディア アウトトロフィカ (*Pseudonocardia autotrophica*)、クリプトコッカス アルビダス (*Cryptococcus albidus*)、クリプトコッカス テレウス (*Cryptococcus terreus*)、コリオルス フィブラ (*Coriolus fibula*)、コリオルス ヒルステュス (*Coriolus hirsutus*)、コリオルス プベセンス (*Coriolus pubescens*)、コリオルス ユニカラー (*Coriolus unicolor*)、コリオルス ベルシカラー (*Coriolus versicolor*)、ユーロチウム グラブラム (*Eurotium glabrum*)、フラムリナ ベルティペス (*Flammulina velutipes*)、ガノデルマアプラナテュム (*Ganoderma applanatum*)、グリオクラディウム アウレウム (*Gliocladium aureum*)、グリオクラディウム ビレンス (*Gliocladium virens*)、ヘリコスティラム ニグリカンズ (*Helicostylum nigricans*)、モルティエラ アルピナ (*Mortierella alpina*)、ピソマイセス アトロオリバセウス (*Pithomyces atro-olivaceus*)、シゾフィラム コミュネ (*Schizophyllum commune*)、トラメテス オリエンタリス (*Trametes orientalis*)、ベルティシリウム アルボーアトルム (*Verticillium albo-atrum*)、ベルティシリウム ダーリアエ (*Verticillium dahliae*)、ベルティシリウム トリコルプス (*Verticillium trico-*

20

30

## 【0015】

さらに具体的には、本発明の糖転移酵素の産生菌として、例えば、*Leifsonia aquatica* IFO 15710、*Paenibacillus alvei* IFO 3343、*Pseudonocardia autotrophica* IFO 12743、*Cryptococcus albidus* IFO 0385、*Cryptococcus terreus* IFO 0727、*Coriolus fibula* IFO 4949、*Coriolus hirsutus* IFO 4917、*Coriolus pubescens* IFO 9782、*Coriolus unicolor* IFO 6265、*Coriolus versicolor* IAM 13013、*Eurotium glabrum* JCM 1967、*Flammulina velutipes* IFO 8329、*Ganoderma applanatum* IFO 31147、*Gliocladium aureum* IFO 9055、*Gliocladium virens* IAM 5061、*Helicostylum nigricans* IFO 8091、*Mortierella alpina* CBS 754.68、*Pithomyces atro-olivaceus* IFO 6651、*Schizophyllum commune* IFO 4928、*Schizophyllum commune* IFO 4929、*Schizophyllum*

40

50

commune IFO 6502、Schizophyllum commune IAM 9006、Schizophyllum commune IAM 13042、Trametes orientalis IFO 6483、Verticillium albo-atrum IFO 9435、Verticillium dahliae IFO 9765、Verticillium dahliae IFO 31024、Verticillium dahliae JCM 9509、Verticillium dahliae JCM 9510、Verticillium tricorpus IFO 31025などの菌株を用いることができる。、上記の菌株はいずれも微生物保存機関から入手可能である。もっとも、本発明の糖転移酵素の産生菌はこれらに限定されることはなく、野生株、変異株、または細胞融合もしくは遺伝子操作などの手法によって誘導される組換え微生物など、いずれの菌株であってもよい。

10

#### 【0016】

前記微生物の培養条件は特に限定されず、通常用いられる培養条件を適宜選択できる。培地の種類も特に限定されず、細菌、真菌、又は酵母などの微生物に適した通常の培地で培養を行うことができ、資化可能な炭素源、窒素源、無機塩類、及び必要な生育促進物質を適宜含有する培地であれば液体又は固体のいずれでもよく、合成培地又は天然培地のいずれも用いることができる。

#### 【0017】

炭素源としては、菌体が資化し生育できる炭素化合物であればいずれでも使用可能である。例えば、グルコース、フルクトース、マルトース、スクロース、デキストリン、可溶性デンプン、糊化デンプン、ソルビトールなどの糖類、メタノール、エタノール、グリセロールなどのアルコール類、フマル酸、クエン酸、酢酸、プロピオン酸などの有機酸類及びその塩類、パラフィンなどの炭化水素類、糖蜜、菜種油などを単独で又は混合して使用することができる。

20

#### 【0018】

窒素源としては、塩酸、硫酸、硝酸、リン酸などの無機酸のアンモニウム塩、フマル酸、クエン酸などの有機酸のアンモニウム塩、硝酸ナトリウム、硝酸カリウムなどの硝酸塩、酵母エキス、ペプトン、肉エキス、コーンステープリカー、大豆加工品、尿素などの有機窒素源を単独で又は混合して用いることができる。

#### 【0019】

無機塩類としては、カリウム、ナトリウム、カルシウム、マグネシウム、マンガン、鉄などの硫酸塩、塩酸塩、炭酸塩、硝酸塩、リン酸塩などをそれぞれ単独で又は混合して用いることができる。さらに、ビタミン類などの通常の培養に用いられる栄養源を適宜添加してもよい。

30

#### 【0020】

培養は、振とう培養機又はジャーファーマンターなどを用いて通気条件下で行うことができ、あるいは嫌気的条件下で行うこともできる。培地のpHは3～10の範囲が好ましく、温度は10～50℃の範囲が好ましく、培養時間は10～500時間が好ましいが、これらの限定されることなく、それぞれの微生物によって適宜決められる。

#### 【0021】

培養後、培養物を濾過又は遠心分離して菌体を得、その菌体を水または適当な緩衝液でよく洗浄する。洗浄した菌体は適量の緩衝液に懸濁して菌体を粉碎する。

40

破碎の方法は特に限定されず、例えば、乳鉢、ダイノミル、ベンチプレスなどを用いた破碎、超音波破碎などの機械的破碎法が挙げられる。得られた菌体の破碎液より不溶物を濾過または遠心分離により除去することにより、本発明の糖転移酵素を含む無細胞の抽出液を得ることができる。この抽出液から本発明の糖転移酵素を分離・採取する方法は特に限定されず、通常用いられる酵素の分離及び精製手段を単独で用い、あるいは複数の手段を適宜組み合わせ用いることができる。

#### 【0022】

例えば、硫酸アンモニウム沈殿などの塩析；セファデックス等によるゲル濾過法；ジエチ

50

ルアミノエチル基又はカルボキシメチル基等を持つ担体等を用いたイオン交換クロマトグラフィー法；ブチル基、オクチル基、フェニル基等の疎水性基を持つ担体等を用いた疎水性クロマトグラフィー法；色素ゲルクロマトグラフィー法；電気泳動法；透析；限外濾過法；アフィニティークロマトグラフィー法；高速液体クロマトグラフィー法；ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー法等の1種又は2種以上を組み合わせる用いることができる。

#### 【0023】

さらに、精製酵素を担体に固定化することにより、固定化酵素を繰り返し使用でき、連続的かつ大量に目的物を製造することができる。酵素の固定化方法は特に限定されず、公知の方法を適宜採用することができる。例えば、共有結合法や吸着法などの担体結合法；架橋法；又は包括法等により固定化できる。また、グルタルアルデヒド、ヘキサメチレンジイソシアネート、ヘキサメチレンジイソチオシアネート等の縮合剤を必要に応じて用いてもよい。他の固定化法としては、例えば、モノマーを重合反応でゲル化させて行うモノマー法；通常モノマーよりも大きな分子を重合させるプレポリマー法；ポリマーをゲル化させて行うポリマー法；ポリアクリルアミドを用いた固定化法；アルギン酸、コラーゲン、ゼラチン、寒天、 $\kappa$ -カラギーナン等の天然高分子を用いた固定化法；光硬化性樹脂、ウレタンポリマー等の合成高分子を用いた固定化法などを挙げることができる。

これらの固定化法の2種以上を適宜組み合わせてもよい。固定化酵素をカラムに充填してバイオリアクターとして回分式と同様の反応条件で一カ月から一年間連続通液を行うことにより、目的物を安価に連続的かつ大量に生産することができる。

#### 【0024】

本発明の糖転移酵素は、上記のようにして本発明の糖転移酵素の産生菌の培養物から分離・採取することができるが、本発明の糖転移酵素をコードする遺伝子を本発明の糖転移酵素の産生菌からクローニングし、この遺伝子を用いて通常の遺伝子組み換えの手法により大腸菌などの汎用の微生物や昆虫細胞などを形質転換し、得られた形質転換体を培養することにより製造することもできる。上記遺伝子のクローニング方法、形質転換体の製造方法などは当業界で周知かつ慣用の方法である。

#### 【0025】

本発明の糖転移酵素を用いた $\alpha$ -グルコシド反応における糖の供与体としては、スクロース、デンプン質、ニゲロースなどのグルコースの $\alpha 1 \rightarrow 3$ 結合体、コージビオースなどのグルコースの $\alpha 1 \rightarrow 2$ 結合体、あるいはこれらの混合物などが使用される。デンプン質としては、菌体が作用して分子間グルコシル化を起こしうるデンプン質であれば得に種類は限定されない。例えば、可溶性デンプン、糊化デンプン、アミロース、アミロペクチン、マルトース、デキストリンなどが挙げられる。基質としての一般式(I)の化合物はその塩を用いてもよく、塩酸塩などが挙げられる。一般式(I)で表される化合物又はその塩は、適当な有機溶媒に溶解し反応に供することができる。有機溶媒としては、ヘキサン、酢酸エチル、エーテル、アセトン、エタノールなどを単独で又は組み合わせ、さらには該溶解液を水性溶液として用いることができる。

#### 【0026】

一般式(I)で表される化合物又はその塩の濃度は特に限定されないが、例えばピリドシキン塩酸塩を用いる場合、0.01~1Mが好ましい。また、反応温度は10~70℃、pHは3~10が好ましく、1~500時間反応させるのが好ましい。pHを一定に維持するためには、例えば、リン酸緩衝液などの緩衝液を使用することができる。

#### 【0027】

反応終了後、適宜の後処理を施すことにより目的物を単離することができる。たとえば、ゲル濾過、活性炭、吸着樹脂、イオン交換樹脂、シリカゲル、ODSなどのクロマトグラフィーによって一般式(II)で表される化合物を含む画分を集めることができる。また、例えば、煎糖晶出法、冷却析出法、又はエタノールなどによる晶出法などによっても目的物を晶出させることができ、必要によって再結晶を行なって目的物を精製することができる。

10

20

30

40

50



## 【0028】

また、 $\alpha$ -グルコシドの製造にあたり、反応液にホウ酸および／またはホウ酸塩を添加することにより5'位の選択性を高めることができる。ホウ酸塩としては、ナトリウムやカリウムなどのアルカリ金属との塩などが用いられ、例えば、メタホウ酸ナトリウム、四ホウ酸二ナトリウム、五ホウ酸ナトリウム、六ホウ酸ナトリウム、八ホウ酸ナトリウム、二ホウ酸ナトリウムなどが挙げられる。また、ホウ酸塩緩衝液として用いることもでき、ホウ酸塩緩衝液として用いる場合、ホウ酸、コハク酸などによりpH 5～8付近に調整して用いることができる。ホウ酸及び／又はホウ酸塩の添加量は特に限定されず、5'選択性を指標として適宜の濃度を選択することが可能であるが、例えば、反応液に対して0.01～1 M程度とすればよい。なお、一般式(11)で表される化合物の検出及び定量は、例えば、HPLCにより行うことができ、目的物の純度はピーク面積比により定量することができる。

10

## 【0029】

## 【実施例】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されることはない。

## 例1：糖転移酵素の精製

*Verticillium dahliae* JCM 9510を4%可溶性デンプン、1%エスサンミート、0.1%リン酸水素二カリウム、0.05%塩化カリウム、0.05%硫酸マグネシウム7水塩、0.001%硫酸第一鉄7水塩、0.1%塩酸ピリドキシンからなる培地10.4 Lに接種し、20℃で8日間培養した。前記培養液を遠心分離機で処理し、湿菌体800 gを得た。この菌体に10 mMリン酸カリウム緩衝液(pH 7)を加え、ダイノミルによる破碎を行い、さらに、超音波破碎を行なった。遠心分離により無細胞抽出液3.2 Lを得た。この無細胞抽出液に、硫酸アンモニウムを添加した。30%飽和から80%飽和にする間に不溶化した部分を集め、10 mMリン酸カリウム緩衝液(pH 7)に溶解し同緩衝液に対して透析を行なった。この酵素液900 mLをDEAE Toyopearl カラム(2.5 cm x 39 cm)に負荷し、0.3 Mの塩化ナトリウムで溶出した。溶出した酵素活性画分を限外ろ過で濃縮し、ヒドロキシアパタイトカラム(2.5 cm x 19.5 cm)に負荷し、リン酸カリウム緩衝液の直線濃度勾配(10 mM→400 mM)で溶出した。溶出した酵素活性画分(部分精製酵素)をSuperdex 200 16/60に負荷し、150 mM塩化ナトリウムを含む10 mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7)で溶出した。精製酵素を含む精製酵素液を得た。このものはネイティブポリアクリルアミドゲル電気泳動において単一のバンドのみを示した。

20

30

## 【0030】

## 1) 酵素活性

0.3 M リン酸カリウム緩衝液(pH 7)、6% デキストリン、0.3 Mピリドキシン塩酸塩を含む溶液200  $\mu$ Lに、2～100倍希釈した酵素液400  $\mu$ Lを加え、40℃で2時間保った。反応液をHPLCで分析してピリドキシン5'- $\alpha$ -グルコシドおよびピリドキシン4'- $\alpha$ -グルコシドの生成率(%)を求めた。下記条件下で1分間に1  $\mu$ molのピリドキシン5'- $\alpha$ -グルコシドが生成する酵素活性を1単位(U)とした。その結果、全活性は16.8 U、比活性は24 U/mgであった。

40

## HPLC条件

カラム：Cosmosil 5C18MS-II ( $\phi$  4.6 x 150 mm)

カラム温度：35℃

溶離液：1.0% メタノール

流速：1.0 mL/min

検出：UV 325 nm

## 【0031】

## 2) 分子量

50

ゲル濾過HPLC（東ソーTSK-GEL 3000SW 7.5mm x 600mm）を用いた分子量測定により、約137,000であった。

### 3) 至適pH

希釈した精製酵素液（0.22 U/mL）20 $\mu$ L、0.2Mピリドキシン塩酸塩0.2M各pH緩衝液50 $\mu$ L、6.67%デキストリン30 $\mu$ Lを加え、60℃で1時間保った。pH緩衝液はpH3～5は酢酸緩衝液、pH5～8はリン酸カリウム緩衝液、pH8～9はトリス塩酸緩衝液、pH9～11は炭酸ナトリウム緩衝液を用いた。各反応液のピリドキシン5'- $\alpha$ -グルコシドおよびピリドキシン4'- $\alpha$ -グルコシドの生成量をHPLCで測定した。ピリドキシン5'- $\alpha$ -グルコシド生成の至適pHは約6～7であった。また、5'位の位置選択性はpH6.4以上で最高値となった（図1）。 10

### 4) 至適温度：

希釈した精製酵素（0.22 U/mL）30 $\mu$ L、0.3Mピリドキシン塩酸塩0.3Mリン酸カリウム緩衝液（pH7）50 $\mu$ L、10%デキストリン30 $\mu$ L、精製水40 $\mu$ L、各温度で1時間保った。各反応液のピリドキシン5'- $\alpha$ -グルコシドおよびピリドキシン4'- $\alpha$ -グルコシドの生成量をHPLCで測定した。その結果、ピリドキシン5'- $\alpha$ -グルコシド生成の至適温度は60℃であった（図2）。

### 【0032】

### 5) pH安定性

希釈した精製酵素（0.17 U/mL）40 $\mu$ LをNaOHとHClを用いて2から12の各pHに調整した（総体積80 $\mu$ L）。これを60℃で0.5時間あるいは2時間加温した。その後、0.3M塩酸ピリドキシン6%デキストリン（松谷化学工業製TK-16）、0.45Mリン酸カリウム緩衝液（pH7）50 $\mu$ Lと精製水を加え、総体積を150 $\mu$ Lとした。これを60℃で1時間反応させ、生成したピリドキシン $\alpha$ -グルコシドをHPLCで測定した。 20

加温していない酵素液を用いて反応させた場合の活性を100とし、各pHで加温後の残存活性を図3に示した。本発明の糖転移酵素は、5.9～9.3の範囲で2時間以上安定（60℃）であることが分かった。

### 【0033】

### 6) 温度安定性

希釈した精製酵素（0.22 U/mL）30 $\mu$ Lに0.3Mリン酸カリウム緩衝液50 $\mu$ Lを加え、40℃から75℃の各温度で0.5時間あるいは2時間加温した。その後0.3M塩酸ピリドキシン6%デキストリン（松谷化学工業（株）TK-16）、0.3Mリン酸カリウム緩衝液（pH7）50 $\mu$ Lと精製水を加え、総体積を150 $\mu$ Lとした。これを60℃で1時間反応させ、生成したピリドキシン $\alpha$ -グルコシドをHPLCで測定した。本発明の糖転移酵素は、60℃以下の温度で2時間以上安定であることが分かった。（図4） 30

### 【0034】

### 例2

例1の方法で得た*Verticillium dahliae*菌体、無細胞抽出液、糖転移酵素を用いてピリドキシンからピリドキシン5'- $\alpha$ -グルコシドを製造した。0.12mmol塩酸ピリドキシン、24mgデキストリン（松谷化学工業（株）TK-16）を含む120mMリン酸カリウム緩衝液（pH7）1.0mLに、培養液1mLから集菌した*Verticillium dahliae*菌体（0.11 U相当分）、無細胞抽出液（0.11 U）、本発明の部分精製酵素（0.11 U）のいずれか一つを加え、総体積1.2mLとし、40℃で20時間加温した。反応液をHPLCで分析し、ピリドキシン5'- $\alpha$ -グルコシド（PN-5'- $\alpha$ -G）およびピリドキシン4'- $\alpha$ -グルコシド（PN-4'- $\alpha$ -G）、その他のピリドキシングルコシドの生成率（%）を求めた。5'選択率（%）は下式を使って算出した。 40

5'選択率（%）＝

（ピリドキシン5'- $\alpha$ -グルコシドの生成率）／（ピリドキシン5'- $\alpha$ -グルコシド 50

生成率とピリドキシン 4' -  $\alpha$  - グルコシド生成率の和)  $\times 100$

結果を表 1 に示す。菌体、無細胞抽出液、及び本発明の酵素を用いて生成率 32% 以上、5' 位の位置選択性 90% 以上でピリドキシン 5' -  $\alpha$  - グルコシドが得られたが、特に本発明の精製酵素を用いた場合には、より高い 5' 位の位置選択性が達成できた。

【0035】

【表 1】

	ピリドキシン- $\alpha$ -グルコシド生成率 (%)		
	PN-5' - $\alpha$ - G	PN-4' - $\alpha$ - G	5' 位選択率 (%)
菌 体	33.5	3.5	90.5
無細胞抽出液	32.6	2.8	92.2
部分精製酵素	34.2	2.9	92.3

10

【0036】

例 3

例 1 で得た糖転移酵素を用いてホウ酸塩存在下でピリドキシンからピリドキシン 5' -  $\alpha$  - グルコシドを製造した。0.12 mmol 塩酸ピリドキシン、24 mg デキストリン (松谷化学工業 (株) TK-16) を含む 30 mM ホウ酸ナトリウム ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ , pH 7) 1.0 mL に、本発明の部分精製酵素 (0.11 U) を加え、総体積 1.2 mL とし、40℃ で 20 時間加温した。反応液を HPLC で分析した。ピリドキシン 5' -  $\alpha$  - グルコシドの生成率は 12.1% であったが、5' 位の位置選択性は 98.4% と非常に高まった。

20

【0037】

【発明の効果】

本発明の糖転移酵素は、例えばピリドキシンからピリドキシン  $\alpha$  - グルコシドを効率的に製造するための酵素として有用である。また、本発明の糖転移酵素は、ホウ酸及び／又はホウ酸塩の存在下で反応を行うことにより 5' 位の位置選択性が高まるので、例えばピリドキシンからピリドキシン 5' -  $\alpha$  - グルコシドを効率的に製造するための酵素として特に有用である。

【図面の簡単な説明】

30

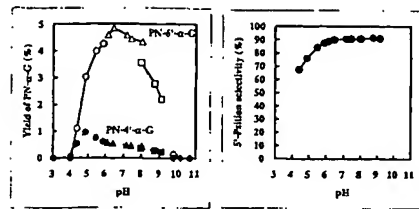
【図 1】本発明の糖転移酵素の活性と pH との関係を示した図である。

【図 2】本発明の糖転移酵素の活性と温度との関係を示した図である。

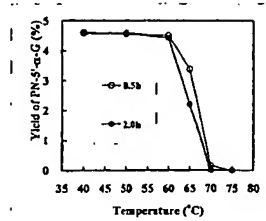
【図 3】本発明の糖転移酵素の pH 安定性を示した図である。

【図 4】本発明の糖転移酵素の温度安定性を示した図である。

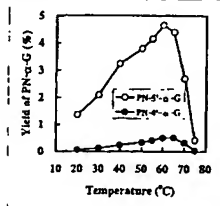
【図 1】



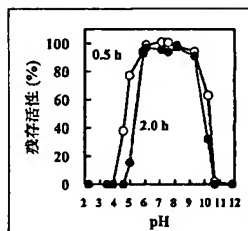
【図 4】



【図 2】



【図 3】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

C 1 2 R 1:645 )

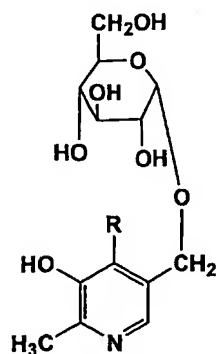
F I

C 1 2 R 1:645

テーマコード (参考)

F ターム(参考) 4B064 AF52 CA02 CA03 CA05 CA06 CA21 CB30 CC03 CD02 CD09  
CD12 DA01

【要約の続き】



(II)

(式中、Rは上記と同義である)で表される化合物を生成することができる糖転移酵素であって、例えばベルティシリウム属に属する微生物に由来し、至適pH: 6~7、至適温度: 約60℃、及び分子量: 約137,000を有する糖転移酵素。

【選択図】 なし